HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Protein Structure Determination using Paramagnetic Magic-Angle Spinning Solid-state NMR [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	田巻, 初
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12264号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61777
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hajime_Tamaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏 名　田 巻　初

学 位 論 文 題 名

Study on Protein Structure Determination using
Paramagnetic Magic-Angle Spinning Solid-state NMR
（常磁性マジック角試料回転固体 NMR 法による
タンパク質立体構造決定に関する研究）

マジック角試料回転(MAS)固体 NMR 法は、不溶性分子の分子構造を解析できる手法である。生命科学分野においては膜タンパク質やアミロイド繊維等、X 線結晶構造解析や溶液 NMR 法では測定・解析が難しい試料に用いられている。近年の装置性能向上や優れたラジオ波パルス系列の開発により、GPCR 等の高難易度ターゲットの構造決定が可能となった。しかし、タンパク質構造解析手法としては未だ発展途上であり、立体構造決定は現在でも非常に難しい。

NMR 法を用いて分子構造を決定するには、化学結合を介さない遠位核間の相関情報が極めて重要である。しかし MAS 固体 NMR 法において、その測定・解析は次の二つの理由により非常に難しい。固体 NMR 法では、^{13}C-^{13}C, ^{13}C-^{15}N 間等の双極子相互作用を媒介とした距離相関測定が広く用いられている。ある核が遠位核間の弱い双極子相互作用と化学結合を伴う非常に強い双極子相互作用に関与する場合、遠位核間の相関が見かけ上消失する、双極子トランケーションと呼ばれる現象が起こる。これを緩和する同位体標識手法やラジオ波系列は開発されているが、双極子相互作用が原子間距離の 3 乗に反比例すること、一つのスペクトルに多数の相関が現れることによるスペクトルの低感度化・複雑化、という根本的な問題があり、測定・解析が難しいことに変わりはない。

この問題は常磁性緩和促進(Paramagnetic relaxation enhancement, PRE)の応用によって解決できると考えられている。PRE は、不対電子-核間の双極子相互作用により、核の緩和が促進される現象である。その効果は両者間の距離の 6 乗に反比例し、影響は 20~25 Å におよぶ。さらに、PRE はスペクトル上に信号の強度減少や広幅化として現われる。システイン残基のチオール基等に常磁性タグ分子を標識し、残基内相関測定等の相関が複雑ではないスペクトルの信号強度を解析することで長距離相関情報を容易に取得できる。このアプローチは溶液 NMR での構造決定では広く使われており、近年、MAS 固体 NMR 法への応用も進められている。

MAS 固体 NMR 法への PRE の応用を妨げる課題として、核間双極子相互作用との干渉や、試料が高密度であるために起こる分子間 PRE によって、信号強度と不対電子-核間距離の定量性が損われることが挙げられる。すなわち、PRE から得られる不対電子-核間距離制限(PRE 制限)は定性的な距離情報となる。よって、MAS 固体 NMR 法で PRE 制限を用いるには、定性的な距離情報を効率的に取り扱うことが必要となる。プロテイン G B1 ドメイン(GB1)をモデルに数値解析と実測により、その検証をおこなった。

本研究 Part1 では、常磁性を示す Mn^{2+}イオン存在下における信号強度の減少についてモデルを構築し、MAS 固体 NMR 法における最適な ^{1}H, ^{13}C-PRE の取り

扱いについて検討をおこなった。Solomon-Bloembergen 方程式に基づいたモデル(SB モデル)の構築し、GB1 結晶構造を用いて分子間 PRE の影響を評価した。つづいて、常磁性の Mn^{2+}と反磁性の Zn^{2+}を配位させた EDTA タグを GB1 に修飾し、^{13}C-^{13}C 相関スペクトルから PRE による信号減衰を解析した。分子間 PRE、核間双極子相互作用との干渉はどちらも不対電子-核間距離が大きくなるほど影響が大きくなることが確認された。強い PRE、弱い PRE が観測された残基について、それぞれ引力、斥力のみの構造制限を用いるグループに分類することで、分子間 PRE や核間双極子相互作用との干渉に起因する問題を回避できると結論づけた。

本研究 Part2 では、引力・斥力のみで記述される PRE 制限を用いた GB1 の立体構造決定をおこなった。まず、上述の PRE 制限と化学シフトから計算された主鎖二面角制限を用い、分子動力学計算に基づいた、標準的な立体構造計算手法によって立体構造決定を試みた。しかし、情報不足から正しい立体構造は得られなかった。そこで主鎖化学シフトを用いるタンパク質立体構造予測法 CS-Rosetta と PRE 制限を組み合わせ、立体構造決定を試みた。PRE 情報がどの程度の情報量を持つのか評価するために、MAS 固体 NMR 法で決定された主鎖化学シフトのみを用いて、CS-Rosetta で立体構造を予測し、PRE 制限のスコア関数でそれらを評価した。PRE 制限の違反がなく、結晶構造との RMSD が最も大きい構造のグローバルフォールドは天然構造と同一であった。Rosetta は立体構造既知のタンパク質の部分構造(フラグメント)を組み合わせることで立体構造を予測する手法であり、分子動力学計算と比べ構造の探索空間は限定される。上の結果は、Rosetta の構造探索空間において、PRE 制限を満たす構造は天然構造と類似したもののみであることを示している。さらに Rosetta の構造予測計算中に PRE 制限の評価を加えた場合、最安定構造の RMSD 改善、天然構造に類似した構造のサンプリング頻度増加が見られた。

引力・斥力のみで記述される PRE 制限と CS-Rosetta の組み合わせが GB1 以外のタンパク質においても有効であるか確認するために、立体構造・化学シフトが既知のタンパク質 3 種類について、立体構造を基に PRE 制限をシミュレートし、立体構造計算をおこなった。いずれの場合においても GB1 と同様の結果が得られた。

以上より、MAS 固体 NMR 法で得られる PRE 情報を引力・斥力のみで記述される距離制限に分類し、CS-Rosetta と組み合わせることによって、効率的かつ簡便にタンパク質立体構造決定が可能であることが示唆された。